

## 明 細 書

## 銅イオンの添加により植物の形質転換効率を向上させる方法

## 技術分野

- [0001] 本発明は、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を効率よく行う方法に関する。

## 背景技術

- [0002] アグロバクテリウム法による遺伝子導入は、アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換方法である。土壌細菌アグロバクテリウム (Agrobacterium tumefaciens) は、植物に感染すると、アグロバクテリウムの病原性に関与しているTi (tumor-inducing) プラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれる機能を有している。アグロバクテリウム法による植物の形質転換方法は、TiプラスミドのT-DNA領域を植物ゲノムに導入を所望する遺伝子に置き換えた形質転換用プラスミドを調製し、当該形質転換用プラスミドをTiプラスミドの代わりに有するように調製したアグロバクテリウムを用いて、上記のアグロバクテリウムの機能を利用することにより、当該植物ゲノムに導入を所望する遺伝子を植物ゲノム中に導入する方法である。
- [0003] アグロバクテリウム属細菌は双子葉植物のみを宿主とし、単子葉植物には寄生しないとされていたため、当初、アグロバクテリウム法による植物の形質転換法は主として双子葉植物の形質転換法として発展した。その後、単子葉植物へのアグロバクテリウム法による遺伝子導入についても様々な試みがなされ、強病原性アグロバクテリウムの病原性遺伝子の一部を有するスーパーバイナリーベクターが開発され、このベクターを用いた方法においては、イネ、トウモロコシなどの単子葉植物においても安定して、比較的効率よく形質転換されることが報告された(例えば、特許第2, 649, 287号公報;特許第3, 329, 819号公報; Hiei, Y., et al., (1994), The Plant Journal, Vol.6, p.271-282; および、Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745-750を参照)。さらに、コムギ、オオムギおよびソルガムといった単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換の成功例が報告され(例えば、Cheng, M., et al., (1997), Plant Physiol., Vol.115, p.971-980; Tingay, S., et al., (1997), Pla

nt J., Vol.11, p.1369-1376; および、Zhao, Z-Y., et al., (2000), Plant Mol. Biol., Vol.44, p.789-798を参照)、単子葉植物についてもアグロバクテリウム法による形質転換が広く行われるに至った。

- [0004] アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、現在では双子葉、単子葉を問わず多くの植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。
- [0005] アグロバクテリウムによる形質転換方法は、植物種により供試材料、培養培地の組成は異なるが、いずれの植物においても材料となる組織にアグロバクテリウム懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出する点は共通している。一般に、材料となる植物組織は、必要に応じ滅菌処理がなされるが、それ以外に特別な処理をすることなくアグロバクテリウムの感染が行われる(例えば、Rogers, S. G., et al., (1988), Method for Plant Molecular Biology, p.423-436, CA: Academic Press Inc.; Visser, R. G. F., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B5:1-9, Kluwer Academic Publishers; McCormick, S., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B6:1-9, Kluwer Academic Publishers; および、Lindsey, K., et al., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B7:1-13, Kluwer Academic Publishers、を参照)。
- [0006] アグロバクテリウムによる形質転換は多くの植物種で報告されているが、その形質転換効率は植物の種、遺伝子型そして材料となる組織により大きく異なる(例えば、Potrykus, I., et al., (1998), Agricultural Biotechnology, NY: Mercel Dekker Inc., p.119-159を参照)という問題点もある。実用遺伝子を導入した品種を育成する場合、多数の形質転換植物を作出する必要がある、一年を通じて高い効率で安定して形質転換植物の得られる技術の開発は重要である。また、植物の種や遺伝子型によらない形質転換法は、効率的に実用品種を育成する上で極めて有用である。さらに、材料となる植物の組織によらない形質転換法の開発も、形質転換を効率的に進める上で必要である。
- [0007] このように遺伝子導入効率を向上させる、あるいは遺伝子導入が困難な植物種や

遺伝子型も形質転換できる方法の開発は重要である。現在までに、培地組成の検討、マーカー遺伝子もしくはプロモーターの改変、供試材料の検討、供試材料の処理方法の検討など、様々な側面から、効率よく形質転換植物を得るための多くの技術が報告されている。例えば、供試材料の処理方法では、組織を付傷することで感染効率を向上させたり、または、組織を付傷せずに植物組織を遠心処理（例えば、国際公開第02/12520号パンフレット；特開2000-342256を参照）、加熱処理（例えば、特開2000-342255；特開2000-342253を参照）したりする方法などが報告されている。また、本発明者らは、植物組織を加圧処理することが遺伝子導入効率の向上に有用であることを見いだしている（結果は未発表である）。

[0008] また、特に単子葉植物の中でもトウモロコシについては、アグロバクテリウム法による形質転換における形質転換効率がイネと比較して低いことが問題であった。これまでも、アグロバクテリウム法によるトウモロコシの形質転換において形質転換効率を向上させるための種々の試みがなされてきた（例えば、Negrotto, D., et al., (2000), Plant Cell Reports, Vol.19, p.798-803; Zhao, Z-Y., et al., (2001), Mol. Breed., Vol.8, p.323-333; Frame, B. R., et al., (2002), Plant Physiol., Vol.129, p.13-22; および、Ishida, Y., et al., (2003), Plant Biotechnology, Vol.14, p.57-66、を参照）。アグロバクテリウム法でのトウモロコシの形質転換効率を向上させる種々の試みとしては、N6基本培地での形質転換細胞の選抜（例えば、Zhao, Z-Y., et al., (2001), Mol. Breed., Vol.8, p.323-333を参照）、培地への硝酸銀およびカルベニシリンの添加（例えば、Zhao, Z-Y., et al., (2001), Mol. Breed., Vol.8, p.323-333; および、Ishida, Y., et al., (2003), Plant Biotechnology, Vol.14, p.57-66を参照）、共存培地へのシステインの添加（例えば、Frame, B. R., et al., (2002), Plant Physiol., Vol.129, p.13-22を参照）等がなされてきたが、その効果はまだ低い。トウモロコシのような主要な穀物であって形質転換効率の低い植物については、特に、実用的な形質転換植物を作出する場合のみならず、新規な遺伝子の効果を確認する場合にも、更に形質転換効率の高い形質転換方法が望まれている。

[0009] 硫酸銅は植物組織培養の多種の培地に微量無機塩として含まれている。通常、植物の組織培養培地に含まれる硫酸銅の濃度は0.1  $\mu$  Mである。近年、単子葉植物

の組織培養および形質転換試験において培地に通常の50～500倍以上の硫酸銅を添加することにより種々の効果のみられることが報告されている。Ghaemiら (Ghaemi, M., et al., (1994), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol.36, p.355-359を参照)はコムギの葍を10mg/lの硫酸銅および2.5～5mg/lの硝酸銀を含む培地で培養することにより胚状体(embryoid)の形成率が高まることを報告した。Zhangら(Zhang, S., et al., (1999), Plant Cell Reports, Vol.18, p.959-966を参照)はオオムギの完熟種子から発芽したシュートを5  $\mu$  M 硫酸銅および30g/l マルトースを含む培地で培養することにより苗条分裂組織培養(shoot meristematic cultures: SMCs)の誘導率が高まること報告した。マルトースは褐変組織の減少に効果があり、硫酸銅は苗条分裂組織培養が誘導されたときのシュートの発育の促進に効果があるとしている。また、未熟胚を硫酸銅を含む培地で培養することにより得られたカルスでは再分化率やカルス当たりの再分化植物数が増大することがオオムギ(例えば、Dahleen, L. S., (1995), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol.43, p.267-269; および、Cho, M-J., et al., (1998), Plant Science, Vol.138, p.229-244を参照)やイネ(例えば、Sahrawat, A. K. and Chand, S., (1999), J. Plant Physiol., Vol.154, p.517-522を参照)で報告されている。さらに硫酸銅を含む培地で誘導された緑色の再分化能を有する組織は形質転換の材料として適したものであるとされている(例えば、Visser, R. G. F., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B5:1-9, Kluwer Academic Publishers; および、McCormick, S., (1991), Plant Tissue Culture Manual, B6:1-9, Kluwer Academic Publishersを参照)。

[0010] Ishidaら(Ishida, Y., et al., (2003), Plant Biotechnology, Vol.14, p.57-66を参照)はアグロバクテリウムを接種し、共存培養を行ったトウモロコシ(品種H99)の未熟胚を1～100  $\mu$  Mの硫酸銅を含む培地で培養し未熟胚からのカルス形成を調査した。1～10  $\mu$  Mの硫酸銅を含む培地でカルス形成率の向上がみられたが、その効果はわずかであった。

[0011] 以上のように高濃度の硫酸銅を培地に添加することにより単子葉植物の組織培養において種々の効果のみられることが報告されている。しかし、銅イオンを含む金属塩の添加が遺伝子導入効率および／または形質転換効率に及ぼす効果を調査した

報告はこれまでにない。

特許文献1:特許第2, 649, 287号公報

特許文献2:特許第3, 329, 819号公報

特許文献3:国際公開第02/12520号パンフレット

特許文献4:特開2000-342256

特許文献5:特開2000-342255

特許文献6:特開2000-342253

特許文献7:米国特許第6, 235, 529号明細書

特許文献8:米国特許第6, 541, 257号明細書

特許文献9:国際公開第95/06722号パンフレット

非特許文献1:Hiei, Y. , et al. , (1994), The Plant Journal, Vol. 6, p. 271-282.

非特許文献2:Ishida, Y. , et al. , (1996), Nature Biotechnology, Vol. 4, p. 745-750.

非特許文献3:Cheng, M. , et al. , (1997), Plant Physiol. , Vol. 115, p. 971-980.

非特許文献4:Tingay, S. , et al. , (1997), Plant J. , Vol. 11, p. 1369-1376

非特許文献5:Zhao, Z-Y. , et al. , (2000), Plant Mol. Biol. , Vol. 44, p. 789-798.

非特許文献6:Rogers, S. G. , et al. , (1988), Method for Plant Molecular Biology, p. 423-436, CA:Academic Press Inc.

非特許文献7:Visser, R. G. F. , (1991), Plant Tissue Culture Manual, B5:1-9, Kluwer Academic Publishers.

非特許文献8:McCormick, S. , (1991), Plant Tissue Culture Manual, B6:1-9, Kluwer Academic Publishers.

非特許文献9:Lindsey, K. , et al. , (1991), Plant Tissue Culture Manual, B7:1-13, Kluwer Academic Publishers.

非特許文献10:Potrykus, I. , et al. , (1998), *Agricultural Biotechnology* , NY:Mercel Dekker Inc. , p. 119–159.

非特許文献11:Negrotto, D. , et al. , (2000), *Plant Cell Reports*, Vol. 19, p. 798–803.

非特許文献12:Zhao, Z-Y. , et al. , (2001), *Mol. Breed.* , Vol. 8, p. 323–333.

非特許文献13:Frame, B. R. , et al. , (2002), *Plant Physiol.* , Vol. 129, p. 13–22.

非特許文献14:Ishida, Y. , et al. , (2003), *Plant Biotechnology*, Vol. 14 , p. 57–66.

非特許文献15:Ghaemi, M. , et al. , (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 36, p. 355–359.

非特許文献16:Zhang, S. , et al. , (1999), *Plant Cell Reports*, Vol. 18, p. 959–966.

非特許文献17:Dahleen, L. S. , (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 43, p. 267–269.

非特許文献18:Cho, M-J. , et al. , (1998), *Plant Science*, Vol. 138, p. 229–244.

非特許文献19:Sahrawat, A. K. and Chand, S. , (1999), *J. Plant Physiol.* , Vol. 154, p. 517–522.

非特許文献20:Trick, H. N. and Finer, J. J. , (1997), *Transgenic Research*, Vol. 6, p. 329–336.

非特許文献21:Amoah, B. , et al. , (2001), *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, P. 1135–1142.

非特許文献22:Hoekema, A. , et al. , (1983), *Nature*, Vol. 303, p. 179–180.

非特許文献23:Komari, T. and Kubo T. , (1999), *Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I. K. (ed.

) Molecular improvement of cereal crops. , Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 43-82.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明が解決しようとする課題は、従来のアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入方法における植物の遺伝子導入効率よりも、高い効率で遺伝子導入のなされる方法を開発することにある。また、従来のアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入方法における植物の供試組織からの形質転換細胞の増殖率よりも高い効率で、形質転換細胞の増殖のなされる方法を開発することにある。さらに、本発明が解決しようとする課題は、前記方法を使用した、形質転換植物の製造方法を開発することにある。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは上記問題解決のため鋭意研究に努めた結果、金属塩の濃度を高めた培地を用いてアグロバクテリウム属細菌を介した植物への遺伝子導入を行うことにより、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いたときと比較して、安定して高い効率で遺伝子導入のなされること、および安定して高い効率で遺伝子導入した組織からの細胞の増殖がみられることを見いだした。さらに、金属塩の濃度を高めた培地を用いて遺伝子導入を行うことに加えて、アグロバクテリウム属細菌に植物材料を感染させる前に、加熱・遠心処理を行うと、安定してさらに高い効率で遺伝子導入のなされることを見いだした。また、遺伝子導入された植物材料について、さらに形質転換体の選抜を行い、金属塩の濃度を高めた培地を用いて遺伝子導入を行った植物材料は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いたときと比較して、飛躍的に形質転換効率が向上することを見いだした。

[0014] したがって、本発明は、

- 1) 植物材料を処理し、
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる、

ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法であって、上記1)および／または2)の工程において銅イオンを含む金属塩の濃度

を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法に関する。

- [0015] 本発明の方法において、培地に高い濃度で添加される金属塩は、銅イオンを含む金属塩である。本発明に用いる好ましい金属塩は、硫酸銅またはグルコン酸銅であり、最も好ましくは硫酸銅である。硫酸銅には、無水塩および含水塩があるが、いずれかに限定されるものではない。
- [0016] 本発明の方法において、金属塩の濃度を高めた培地とは、当業者によく知られているN6基本培地、MS (LS) 基本培地、B5基本培地、NN基本培地、NT基本培地、Kaoの基本培地、Whiteの基本培地などの基本培地に含まれる金属塩の濃度と比較して高濃度の金属塩を含む培地をいう。高濃度とは、当該基本培地に含まれる金属塩の濃度よりも高いことを言う。
- [0017] 具体的には、各基本培地の金属塩の濃度、例えば $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 濃度は、N6基本培地では $0\text{mg/l}$ 、MS (LS) 基本培地では $0.025\text{mg/l}$ 、B5基本培地では $0.025\text{mg/l}$ 、NN基本培地では $0.025\text{mg/l}$ 、NT基本培地では $0.025\text{mg/l}$ 、Kaoの基本培地では $0.025\text{mg/l}$ 、Whiteの基本培地では $0\text{mg/l}$ であり、これらの基本培地をもとに作成した培地において、当該基本培地に含まれる硫酸銅の濃度よりも高濃度の硫酸銅を含む場合には、その培地は金属塩の濃度を高めた培地である。
- [0018] 本発明における、銅イオンを含む金属塩とは、例示した基本培地に一般に、含まれていないか、または微量に含まれる銅イオンを含む金属塩を意味する。
- [0019] 好ましい濃度の例を挙げると硫酸銅およびグルコン酸銅では $1\text{--}100\text{ }\mu\text{M}$ 、好ましくは $1\text{--}50\text{ }\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $1\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$ である。
- [0020] 本発明の方法において、金属塩の濃度を高めた培地を用いる工程は、1) 植物材料を調製する工程、および／または2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程のいずれか1の工程である。好ましくは少なくとも2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程で金属塩の濃度を高めた培地を用いる。さらに好ましくは、少なくとも2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程に含まれる、共存培養の段階で金属塩の濃度を高めた培地を用いる。
- [0021] 本発明の方法においては、さらに遺伝子導入効率を向上させるために、植物材料を調製する工程1)、および／または、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工



程2)において、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からなる群から選択される少なくとも1の処理を植物材料に行うことを更に含んでもよい。植物材料の加圧処理は、当該植物を液体培地中で1.7〜10atmで0.1秒間〜4時間、好ましくは2.4〜8atmで1秒間〜30分間、加圧することで行う。植物材料の加熱処理は、当該植物材料を文献(特開2000-342255;および、特開2000-342253)に記載の方法により処理することができ、たとえば、33〜60℃で5秒間〜24時間、好ましくは46℃、3分間加熱することで行う。植物材料の遠心処理は、当該植物材料をHieiらの方法(国際公開第02/12520号パンフレット;および、特開2000-342256)により処理することができ、たとえば、100G〜25万Gで1秒間〜4時間、好ましくは2万Gで10分間遠心することで行う。超音波処理については、文献(例えば、Trick, H. N. and Finer, J. J., (1997), Transgenic Research, Vol.6, p.329-336; および、Amoah, B., et al., (2001), Journal of Experimental Botany, Vol.52, p.1135-1142)に記載されている方法により処理することができる。

これらの加圧処理、加熱処理、遠心処理、および超音波処理の処理はいずれか1つを行ってもよく、また複数組み合わせを行ってもよい。

[0022] 本発明の方法は、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)に次いで、さらに、

- 3) 形質転換細胞を選抜し、
- 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、

工程を含んでもよい。

[0023] また、本発明の方法は、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)に次いで、さらに、少なくとも以下の1の工程において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いて、

- 3) 形質転換細胞を選抜し、
- 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、

工程を含んでもよい。

[0024] 本発明の遺伝子導入方法は、遺伝子導入効率を向上させるとともに、形質転換効率を向上させ、結果として形質転換された植物を効率よく得ることができる。したがっ

て、本発明は、本発明の遺伝子導入方法を使用することを特徴とする、形質転換植物の製造方法にも関する。

[0025] さらに本発明者らは、形質転換された植物材料について、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いて形質転換体を再分化させることにより、通常の濃度の銅イオンを含む金属塩を含む培地を用いたときと比較して再分化植物の生長が促進されることを見いだした。

[0026] したがって、本発明はさらに、

- 1) 植物材料を調製し、
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させ、
- 3) 形質転換細胞を選抜し、
- 4) 選抜された形質転換体を再分化する、

ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介した植物材料の形質転換による形質転換植物の製造方法であって、上記4)の工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法に関する。

[0027] または、本発明は、脱分化した植物細胞から植物体を再分化させる工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、再分化植物の生長を促進させる方法、に関する。この場合、脱分化した植物細胞は、形質転換細胞であってもなくてもよく、また、形質転換細胞であった場合には、アグロバクテリウム法により形質転換されていていてもされていなくてもよい。

#### アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入および形質転換方法

アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入は、一般には以下の工程を含む：

- a) 植物材料を調製する工程；
- b) 所望の導入遺伝子を含むベクターを含むアグロバクテリウム属細菌を調製する工程；
- c) 工程a)で調製した植物材料をb)で調製したアグロバクテリウム属細菌に感染させる工程。

[0028] さらに、形質転換体を得るために、上記工程c)に次いで

- d) 形質転換細胞を選抜する工程；および

e) 所望により選抜された形質転換体を再分化する工程を施してもよい。

[0029] 具体的には、単子葉植物においては、文献(特許第2, 649, 287号公報)に記載されているように、上記a)の工程でオーキシシン(例えば、2, 4-D(2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸))またはサイトカイニン等を含む培地で培養して植物材料を脱分化の状態または脱分化過程にある状態にし、上記c)の工程でアグロバクテリウムに感染させることを特徴とする方法;または、文献(特許第3, 329, 819号公報)に記載されているように、植物材料として当該植物の未熟胚を用い、上記a)の工程では未熟胚を脱分化処理せず、上記c)の工程においてオーキシシン(例えば、2, 4-D)またはサイトカイニン等を含む培地で培養することを特徴とする方法を用いることができる。

[0030] 工程a)について

本明細書において、遺伝子導入に供される「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。単子葉植物には、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガス、ソルガムその他が含まれるがこれらに限定されるものではない。双子葉植物にはタバコ、ダイズ、ジャガイモ、ワタ、ヒマワリ、その他が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、植物は単子葉植物であり、最も好ましくはトウモロコシである。

[0031] また、「植物材料」とは、非限定的に、アグロバクテリウム法による植物の形質転換に供するための当該植物の細胞、葉、根、茎、実、その他いずれの部位の植物組織、未熟胚、カルスもしくは不定胚様組織(以下、本明細書においてカルス等、または単にカルスという)、または完全な植物体など植物のあらゆる態様を包含する。

[0032] 本発明の方法に用いる植物の形態として好ましいのは未熟胚またはカルスであり、最も好ましいのは未熟胚である。本明細書において、植物の細胞、組織、完全な植物体という表現は、技術分野において一般的に用いられる意味で用いられる。本明細書において、未熟胚とは、受粉後の登熟過程にある未熟種子の胚をいう。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ(熟期)は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよい。もっとも、受粉後2日以降のものが好ましい。後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、正常な個体を再生

する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインブレット、インブレット間のF1、インブレットと自然受粉品種間のF1、市販F1品種の未熟胚であることが好ましい。本明細書において、カルスとは、無秩序に増殖する未分化状態の細胞塊をいう。カルスを得るためには、植物組織の分化した細胞をオーキシン(例えば、2, 4-D)またはサイトカイニン等の植物成長調節物質を含む培地(脱分化培地という)において培養して得ることができる。このカルスを得るための処理を脱分化処理といい、またこの過程を脱分化過程という。

- [0033] 工程a)において、必要に応じ、植物組織、未熟胚などを植物体、種子などから取り出し、形質転換に好適な材料を調製する。また、所望により植物材料をアグロバクテリウムに感染させる前に培養してもよい。
- [0034] 本発明では、工程a)で植物材料を調製する過程、および／または、工程c)でアグロバクテリウムに感染させる過程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする。加えて、工程a)で植物材料を調製する過程において加圧処理を行ってもよい。
- [0035] 工程b)について
- 土壌細菌アグロバクテリウム(Agrobacterium tumefaciens)が多くの双子葉植物に根頭癌腫病(crown gall disease)を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与すること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン(サイトカイニンとオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域(vir領域)に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌であるAgrobacterium rhizogenesもRiプラスミドによる同様なシステムを有している(例えば、特開2000-342256の図3および図4)。
- [0036] アグロバクテリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが

期待された。しかしながら、Tiプラスミドは190kb以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

[0037] まず、腫瘍性のTiプラスミドのT-DNAからホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系(disarmed strains)であるLBA4404(Hoekema, A., et al., (1983), Nature, Vol.303, p.179-180参照)、C58C1(pGV3850)、GV3Ti11SEなどが作製された。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA中に、あるいは所望の遺伝子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型TiプラスミドのT-DNA領域中に、三系交雑法(triparental mating)を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる。

[0038] もう一つは、バイナリーベクター(binary vector)法とよばれるもので、T-DNAの植物への組み込みにvir領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果に基づいている。このvir領域にはvirA、virB、virC、virD、virEおよびvirGが存在し、(植物バイオテクノロジー事典(エンタプライズ株式会社発行(1989)))、vir領域とはこのvirA、virB、virC、virD、virEおよびvirGの全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiプラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。

[0039] アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの、公知の方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19、pBI121、pGA482などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Riプラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

[0040] アグロバクテリウムA281は、強病原性(super-virulent)の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い。この特性は、A281が有するTiプラ

スミドのpTiBo542によるものである。pTiBo542を用いて、これまでに2つの新しいシステムが開発されている。一つはpTiBo542のディスアーム型のTiプラスミドを有する菌系EHA101およびEHA105を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。

- [0041] もう一つは、スーパーバイナリーベクター（‘super-binary’ vector）（Hiei, Y., et al., (1994), The Plant Journal, Vol.6, p.271-282; Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745-750; Komari, T. and Kubo T., (1999), Methods of Genetic Transformation: *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I. K. (ed.) Molecular improvement of cereal crops., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.43-82; および国際公開第95/06722号パンフレットを参照）システムである（例：特開2000-342256の図4）。このシステムは、vir領域（virA、virB、virC、virD、virEおよびvirG（以下、これらをそれぞれ「vir断片領域」ということもある。））を持つディスアーム型のTiプラスミドおよびT-DNAを有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一つである。しかしながら、T-DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターにvir断片領域のうち、少なくとも一つのvir断片領域を実質的に取除いたvir領域の断片（このうち好ましくは少なくともvirBまたはvirGを含む断片、さらに好ましくはvirBおよびvirGを含む断片）を組み込んだスーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだT-DNA領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる。
- [0042] 本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens*（例えば上述の*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404（Hoekema, A., et al., (1983), Nature, Vol.303, p.179-180を参照））およびEHA101を好ましく用いることができる。
- [0043] 本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性（vir）領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原

性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した、異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である(例えば、アグロバクテリウム属細菌のvir領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型のT-DNA領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

[0044] 植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT-DNA領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選抜マーカーに基づいて選抜することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常サブクローニングの手法では所望のDNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用することで目的のDNAを導入することができる。限定されるわけではないが、導入される遺伝子の大きさは好ましくは約100bpないし200kbpである。

[0045] また、プラスミドをAgrobacterium tumefaciens等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

[0046] 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

[0047] 工程c)について

アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物材料をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6$  ～  $10^{11}$  細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物材料を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

- [0048] 好ましくは、植物材料をアグロバクテリウムに感染させると同時に、あるいは感染後、アグロバクテリウムを除去する前に、植物材料をアグロバクテリウムと共存培養させる。共存培養には公知の培地を使用できる。例えば、実施例で使用したLS-AS培地、nN6-As培地、あるいはその他、N6S3-AS培地、2N6-AS培地 (Hiei, Y., et al., (1994), The Plant Journal, Vol.6, p.271-282を参照) 等の培地が知られている。
- [0049] 本発明において、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程c)の前または最中に、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からなる群から選択される、少なくとも1つの処理を植物材料に行ってもよい。これらの処理も、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入する方法において、遺伝子導入の効率を高めることが知られている。例えば、遠心処理については、文献(例えば、国際公開第02/12520号パンフレット; および、特開2000-342256)に記載されており、好ましくは、100Gないし25万Gで1秒間ないし4時間、遠心することで行う。熱処理については、文献(例えば、特開2000-342255)に記載されており、好ましくは、33℃ないし60℃の温度範囲で、5秒間ないし24時間の熱処理を行う。さらに、超音波処理については、文献(例えば、Trick, H. N. and Finer, J. J., (1997), Transgenic Research, Vol.6, p.329-336; および、Amoah, B., et al., (2001), Journal of Experimental Botany, Vol.52, p.1135-1142)に記載されている。
- [0050] これらの加圧、加熱、遠心、および超音波等の処理はいずれか1つを行ってもよく、また複数組み合わせを行ってもよい。例えば、Rogers, S. G., et al., (1988), Method for Plant Molecular Biology, p.423-436, CA: Academic Press Inc.は、熱処理と遠心処理を組み合わせを行うことについて記載している。
- [0051] 工程d)およびe)について  
さらに所望により、形質転換体を得るためには、上記工程c)に次いで



d) 形質転換細胞を選抜する工程; および

e) 所望により選抜された形質転換体を再分化する工程

が必要である。即ち、一般に植物の形質転換を行うためには、植物細胞に外来遺伝子を導入した後に、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれた植物細胞を選抜することが必要である。

[0052] 本発明では、工程d)で形質転換細胞を選抜する工程、および／または、工程e)で所望により選抜された形質転換体を再分化する工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いてもよい。

[0053] 形質転換された細胞を選抜する工程は、表現型のデータおよび／または物理的データにより、目的の形質を有する細胞を選抜することを意味する。

[0054] 表現型のデータは、例えば、形質転換効率は植物への導入を所望する遺伝子と共に、マーカー遺伝子および／または選抜マーカー遺伝子を導入してその発現を評価することで行うことで得ることができる。マーカー遺伝子および／または選抜マーカー遺伝子としては、例えば、GUS ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 遺伝子、および／または、抗生物質耐性遺伝子 (例えば、PPT (フォスフィノスライシン) 耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子) など、を用いることができる。マーカー遺伝子としてGUS遺伝子を用いた場合、形質転換効率の評価はX-gulc (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸) のGUSによる切断に伴う発色から評価することができる。選抜マーカー遺伝子として抗生物質耐性遺伝子を用いた場合には、形質転換した後、抗生物質を加えた選抜培地上での成長の度合いから評価することができる。

[0055] さらに、外来遺伝子が安定して染色体に組み込まれたことを確認するために、サザンブロット等の物理的データを得てもよい。また、有性生殖による子孫への伝達、並びに子孫集団への遺伝的および分子的分析に基づく選抜、の工程を行ってもよい。

[0056] 所望により選抜された形質転換体の再分化を行い、再分化個体を生育させ、そして完全な植物体を得てもよい。選抜した形質転換細胞から完全な植物体を再生するには、公知の方法 (例えば、Hiei, Y., et al., (1994), The Plant Journal, Vol.6, p.271-282; および、Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745-750) により行うことができる。

[0057] 本発明の方法は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いた場合と比較して、遺伝子導入効率および／または形質転換効率を向上させ、および／または再分化植物の生長を促進させる。遺伝子導入効率は、例えば、導入した遺伝子の一過性の発現の範囲を評価することにより行うことによって評価できる。後述の実施例では、未熟胚の胚盤でのGUS遺伝子の一過性の発現を1(スポット状の発現が散見)〜5(胚盤の全面で発現)の5段階の指数で評価した。あるいは、全体の発現量が低い場合には、全てのスポット数を数えることにより評価することもできる。

[0058] 形質転換効率は、例えば、接種した未熟胚から得られた再分化植物のうちGUS遺伝子の発現を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除すことによって算出できる。あるいは、再分化植物のうち、選抜圧に対して抵抗性を示したものを形質転換体として数え、その総数を接種した未熟胚の数で除することにより算出することもできる。

[0059] 再分化植物の生長促進は、例えば再分化植物の葉長、葉面積、および／または重量を、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いた場合と、金属塩の濃度を高めた培地を用いた場合とで比較することにより、評価することができる。

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 図面の簡単な説明

[0060] [図1]図1は、共存培地への硫酸銅の添加による、トウモロコシ(A188)のGUS遺伝子の一過的発現に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位の範囲を数値化した値であり、0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の範囲で数値化した。グラフの横軸に示す“Cu x”(ここで、xは数字を表す)は、共存培地中の硫酸銅濃度がx  $\mu$  Mであることを示す。

[図2]図2は、共存培養後のトウモロコシ(H99)のカルス形成に及ぼす、共存培地中の硫酸銅濃度の効果を示すグラフである。グラフの横軸における、“Ag x”および“Cu x”(ここで、xは数字を表す)はそれぞれ、共存培地中の硝酸銀および硫酸銅の濃度がx  $\mu$  Mであることを示す。

[図3]図3は、共存培養後のトウモロコシ(A188)のフォスフィノスライシン(PPT)抵抗性カルス形成に及ぼす、共存培地中の硫酸銅濃度の効果を示すグラフである。縦軸は、カルス形成を数値化した値であり、0(カルス形成なし)から3(胚盤全体がカルス化)の段階で数値化した。グラフの横軸に示す“Cu x”(ここで、xは数字を表す)は、共存培地中の硫酸銅濃度がx  $\mu$  Mであることを示す。

[図4]図4は、共存培地への硫酸銅の添加による、イネ(IR64)のGUS遺伝子の一過的発現に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位の範囲を数値化した値であり、0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の範囲で数値化した。グラフの横軸に示す“Cu 5”は、共存培地中の硫酸銅濃度が5  $\mu$  Mであることを示す。

[図5]図5は、共存培地へのグルコン酸銅の添加による、トウモロコシ(A188)のGUS遺伝子の一過的発現に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位の範囲を数値化した値であり、0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の範囲で数値化した。

[図6]図6は、共存培地へのグルコン酸銅の添加による、トウモロコシ(A188)のカルス形成に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、カルス形成を数値化した値であり、0(カルス形成なし)から3(胚盤全体がカルス化)の段階で数値化した。

[図7]図7は、共存培地への硫酸銅あるいはグルコン酸銅の添加による、イネ(ゆきひかり)の未熟胚の増殖に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、カルス化した未熟胚の重量の1未熟胚あたりの平均値である。横軸の実験1、2、3はそれぞれ独立に行われた実験を示す。cont.は硫酸銅あるいはグルコン酸銅を含まない対照を、Cuは硫酸銅を、CGはグルコン酸銅をそれぞれ示す。CuおよびCGの後の数値はそれぞれの共存培地中の濃度( $\mu$  M)を示す。

[図8]図8は、再分化培地への硫酸銅あるいはグルコン酸銅の添加による、トウモロコシ(A188)形質転換カルスから再分化した形質転換植物の生長に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、再分化した植物の葉長の平均値である。横軸cont.は硫酸銅あるいはグルコン酸銅を含まない対照を、Cuは硫酸銅を、CGはグルコン酸銅をそれぞれ示す。硫酸銅およびグルコン酸銅それぞれの共存培地中に10  $\mu$  Mで添加し

た。

[図9]図9は、再分化培地への硫酸銅あるいはグルコン酸銅の添加による、イネ(ゆきひかり)形質転換カルスから再分化した形質転換植物の生長に及ぼす効果を示すグラフである。縦軸は、再分化した植物の葉長の平均値である。横軸cont.は硫酸銅あるいはグルコン酸銅を含まない対照を、Cuは硫酸銅を、CGはグルコン酸銅をそれぞれ示す。硫酸銅およびグルコン酸銅それぞれの共存培地中に10  $\mu$  Mで添加した。

## 実施例

### [0061] 実施例1 共存培地への硫酸銅の添加がトウモロコシの形質転換に及ぼす効果

#### 材料および方法

受粉後7から14日目のトウモロコシ(品種:A188、H99)の未熟胚(大きさ1.0–1.5mm)を無菌的に採取し、LS-inf液体培地(LS無機塩、0.5mg/l ニコチン酸、0.5mg/l ピリドキシン塩酸塩、1mg/l チアミン塩酸塩、100mg/l ミオーイノシトール、1g/l カザミノ酸、1.5mg/l 2,4-D、68.5g/l シュークロース、36g/l グルコース、pH5.2;Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745–750を参照)で1回洗浄した。遺伝子導入効率を高めるための前処理(46℃、3分間の熱処理および15,000rpm、10分間の遠心処理)を一部の未熟胚で行った。100  $\mu$  Mアセトシリンゴンを含むLS-inf液体培地に約1.0 $\times$ 10<sup>9</sup> cfu/mlでAgrobacterium tumefaciens LBA4404(pSB131)(T-DNA領域にカリフラワーモザイクウイルス 35SプロモーターでドライブされたPPT(フォスフィノスライシン)耐性遺伝子、およびカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーターにヒマ カタラーゼイントロンを結合したGUS遺伝子を有する;Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745–750を参照)を懸濁し接種源とした。採取・洗浄した未熟胚および熱・遠心処理した未熟胚に接種源を加え、30秒間攪拌した後、5分間室温で静置した。5  $\mu$  M AgNO<sub>3</sub>を含むLS-AS培地(LS無機塩、0.5mg/l ニコチン酸、0.5mg/l ピリドキシン塩酸塩、1mg/l チアミン塩酸塩、100mg/l ミオーイノシトール、700mg/l L-プロリン、1.5mg/l 2,4-D、20g/l シュークロース、10g/l グルコース、500mg/l MES、100  $\mu$  M アセトシリンゴン、8g/l 寒天、pH5.8;Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745–750を参照

、固化剤は8g/lアガロース)に0-10  $\mu$  Mの濃度で $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を添加した共存培地にアグロバクテリウムを接種した未熟胚を胚盤が上になるように置床した。

[0062] 25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部の未熟胚を0.1%のTriton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸(X-gluc)および20%メタノール含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、顕微鏡下で観察し、青色を呈する組織の範囲を調査した。

[0063] 共存培地上で3日間培養した未熟胚をLSD1.5培地(LS無機塩、0.5mg/lニコチン酸、0.5mg/lピリドキシン塩酸塩、1mg/lチアミン塩酸塩、100mg/lミオ-イノシトール、700mg/lL-プロリン、1.5mg/l2,4-D、20g/lシュクロース、500mg/lMES、8g/l寒天、pH5.8;Ishida, Y., et al., (1996), Nature Biotechnology, Vol.4, p.745-750を参照)に置床し、25℃、暗黒下で約4週間培養した後、増殖したカルスの直径を測定した。また、共存培地上で7日間培養した未熟胚を5mg/lのフォスフィノスライシン(PPT)を含むLSD1.5培地に置床し、25℃、暗黒下で1週間培養した後、顕微鏡下で観察し、カルス形成の程度を調査した。さらにこれらのカルスを10mg/lPPTを含む同培地で6週間、同条件で培養した。増殖したPPT抵抗性カルスをLSZ再分化培地(LSD1.5培地から2,4-Dを除き、5mg/lゼアチンを添加)に置床し、25℃、照明下で2-3週間培養した。再分化した植物の葉片を切り取り、GUS遺伝子の発現をX-glucにより調査した。

#### [0064] 結果

各種共存培地で3日間培養した未熟胚(品種A188)をX-glucにより染色し、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位(青色を呈する部位)の範囲を0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の5段階で評価した。

[0065] 1、5および10  $\mu$  Mの硫酸銅を含む共存培地で3日間培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ胚盤の広い範囲でGUS遺伝子の一過的な発現を示した。共存培地に硫酸銅を添加することによるGUS遺伝子の一過的発現を示す範囲の増大は熱・遠心の前処理の有無に関わらず認められた(図1)。これらのことから、共存培地に硫酸銅を添加することにより遺伝子導入効率が高まることが明らかとなつ

た。

- [0066] 各種の共存培地で3日間培養を行った未熟胚(品種H99)を選抜圧を含まない培地で約4週間培養した後、形成されたカルスの直径を調査した。5  $\mu$  M 硝酸銀を含む共存培地で培養した未熟胚は対照の培地で培養したものと同様のカルス増殖を示した。これに対し、10  $\mu$  M 硫酸銅および5  $\mu$  M 硝酸銀を添加した共存培地で培養した未熟胚は直径の平均が対照の共存培地で培養した未熟胚に比べ2mm以上も大きく、硫酸銅の添加によりカルスの増殖が促進することが示された(図2)。
- [0067] 1週間の共存培養後、PPTを含む選抜培地で1週間培養した未熟胚(品種A188)から増殖したカルスを0(カルス形成なし)から3(胚盤全体がカルス化)の4段階で評価した。硫酸銅を添加した培地で培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ高いカルス形成を示し、硫酸銅の添加により形質転換カルス形成の効率が向上することが明らかとなった(図3)。さらにPPTを含む培地で選抜を行い得られたカルスをPPTを含む再分化培地で培養することによりPPT抵抗性植物を得た。これらの植物の葉片を切り取り、GUS遺伝子の発現を調査した。その結果、5および10  $\mu$  M 硫酸銅を含む共存培地で培養した未熟胚では硫酸銅を含まない共存培地で培養した未熟胚に比べ2〜3倍の高い形質転換効率を示した(表1)。

[0068] [表1]

表1 共存培地への硫酸銅の添加が形質転換効率に及ぼす効果

CuSO <sub>4</sub> ( $\mu$ M)	接種未熟胚数 (A)	再分化植物数	GUS陽性植物数 (B)	形質転換効率 (B/A, %)
0	13	2	2	15.4
1	13	2	2	15.4
5	13	6	6	46.2
10	14	6	5	35.7

以上のように共存培地への硫酸銅の添加はアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率を高め、カルス形成および増殖を促進し、形質転換効率を向上させる効果のあることが示された。

#### 実施例2 共存培地への硫酸銅の添加がイネへの遺伝子導入に及ぼす効果

##### 材料および方法

50mg/lハイグロマイシンおよび50mg/lスペクチノマイシンを含むAB培地(3g

$1/1 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $1\text{g}/1 \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $1\text{g}/1 \text{ NH}_4\text{Cl}$ 、 $300\text{mg}/1 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $1$   
 $50\text{mg}/1 \text{ KCl}$ 、 $10\text{mg}/1 \text{ CaCl}_2$ 、 $2.5\text{mg}/1 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $5\text{g}/1$  グルコース  
 、 $15\text{g}/1$  寒天、 $\text{pH}7.0$ ; Chilton, M. -D., et al., (1974), Proc. Natl. Ac  
 ad. Sci. U. S. A., 71:3672-3676) 上で3-4日間培養した *Agrobacterium tumefaciens* スーパーバイナリーベクター LBA4404 (pSB134) (T-DNA領域に  
 トウモロコシユビキチンプロモーターでドライブされたユビキチンイントロンを結合した  
 HPT遺伝子(ハイグロマイシン耐性遺伝子)およびカリフラワーモザイクウイルス35S  
 プロモーターでドライブされたヒマカタラーゼイントロンを結合したGUS遺伝子を有す  
 る; pSB134の作成はpKY205(WO 03/027290を参照)に発現マーカーとして  
 pSB32由来の35S-intron GUS-nos断片をHindIII部位に挿入することにより行  
 った)を白金耳でかきとり、約 $10^9$  cfu/mlの濃度で $100 \mu\text{M}$ アセトシリンゴンを含む  
 AA1液体培地(AA主要無機塩、LS微量無機塩、MSビタミン、AAアミノ酸、 $0.2\text{g}/1$   
 $1$ カザミノ酸、 $4\text{g}/1$ シュクロース、 $2\text{g}/1$ グルコース、 $\text{pH}5.2$ ) $1\text{ml}$ に懸濁した。無  
 菌的に採取した未熟胚(品種IR64)を入れたエッペンドルフチューブにアグロバクテ  
 リウム懸濁液 $1\text{ml}$ を加え、30秒間ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で5分間静置  
 した。未熟胚をnN6-As培地(N6無機塩、N6ビタミン、 $0.5\text{g}/1$ カザミノ酸、 $0.5\text{g}/1$   
 $1$  L-プロリン、 $1\text{mg}/1$  2, 4-D、 $0.5\text{mg}/1$  NAA、 $0.1\text{mg}/1$  6BA、 $20\text{g}/1$   
 シュクロース、 $10\text{g}/1$ グルコース、 $10 \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ 、 $100 \mu\text{M}$ アセトシリンゴン、  
 $8\text{g}/1$ アガロース、 $\text{pH}5.2$ )および $5 \mu\text{M}$ の $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を含むnN6-As培地に置  
 床し、暗黒下、 $25^\circ\text{C}$ で1週間培養した。

[0069] 結果

共存培養後の未熟胚をX-glucにより染色し、GUS遺伝子の一過的発現を示す部  
 位(青色を呈する部位)の範囲を0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の5段階  
 で評価した。

[0070]  $5 \mu\text{M}$ の硫酸銅を含む共存培地で1週間培養した未熟胚は対照の培地で培養した  
 未熟胚に比べ胚盤の広い範囲でGUS遺伝子の一過的な発現を示した(図4)。この  
 ことから、共存培地への硫酸銅の添加による遺伝子導入効率の向上はトウモロコシだ  
 けでなく、イネにおいてもみられることが明らかとなった。

### 実施例3 共存培地へのグルコン酸銅の添加がトウモロコシへの遺伝子導入に及ぼす効果

#### 材料および方法

受粉後7から14日目のトウモロコシ(品種:A188)の未熟胚(大きさ1.0–1.5mm)を無菌的に採取し、LS-inf液体培地で1回洗浄した。遺伝子導入効率を高めるための前処理(46℃、3分間の熱処理および15,000rpm、10分間の遠心処理)を行った。100  $\mu$  Mアセトシリンゴンを含むLS-inf液体培地に約 $1.0 \times 10^9$  cfu/mlでAgrobacterium tumefaciens LBA4404(pSB131)を懸濁し接種源とした。熱・遠心処理した未熟胚に接種源を加え、30秒間攪拌した後、5分間室温で静置した。5  $\mu$  M AgNO<sub>3</sub>を含むLS-AS培地に0–10  $\mu$  Mの濃度でグルコン酸銅を添加した共存培地にアグロバクテリウムを接種した未熟胚を胚盤が上になるように置床した。

[0071] 25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部の未熟胚を0.1%のTriton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸(X-gluc)および20%メタノール含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、顕微鏡下で観察し、青色を呈する組織の範囲を調査した。

[0072] また、共存培地上で7日間培養した未熟胚におけるカルス形成を0(カルス形成なし)、1(胚盤の一部がカルス化)、2(胚盤の約半分がカルス化)、3(胚盤の3/4以上がカルス化)の指数で評価した。

#### 結果

各種共存培地で3日間培養した未熟胚(品種A188)をX-glucにより染色し、GUS遺伝子の一過的発現を示す部位(青色を呈する部位)の範囲を0(無発現)から4(胚盤のほぼ全面で発現)の5段階で評価した。1、5および10  $\mu$  Mのグルコン酸銅を含む共存培地で3日間培養した未熟胚は対照の培地で培養した未熟胚に比べ胚盤の広い範囲でGUS遺伝子の一過的な発現を示した(図5)。

[0074] 共存培地で1週間培養した未熟胚のカルス形成を調査した。1、5および10  $\mu$  Mのグルコン酸銅を含む共存培地で培養した未熟胚はいずれもグルコン酸銅を含まない培地で共存培養した未熟胚に比べ高いカルス形成を示した。特に5および10  $\mu$  Mの



グルコン酸銅を含む共存培地では対照に比べ有意に高いカルス形成を示した(図6)。

[0075] これらのことから、共存培地にグルコン酸銅を添加することにより硫酸銅を添加した時と同様に遺伝子導入効率及びカルス形成率が高まることが明らかとなった。

#### 実施例4 接種源液体培地への硫酸銅およびグルコン酸銅の添加がイネへの遺伝子導入に及ぼす効果

##### 材料および方法

50mg/lハイグロマイシンおよび50mg/lスペクチノマイシンを含むAB培地上で3〜4日間培養した*Agrobacterium tumefaciens*スーパーバイナリーベクター LB A4404 (pSB134)を白金耳でかきとり、約 $10^9$  cfu/mlの濃度で100  $\mu$  Mアセトシリゴンおよび0〜50  $\mu$  Mの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ あるいはグルコン酸銅を含むAA1液体培地1mlに懸濁した。無菌的に採取した未熟胚(品種ゆきひかり)を入れたエッペンドルフチューブにアグロバクテリウム懸濁液1mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で5分間静置した。未熟胚をnN6-As培地に置床し、暗黒下、25℃で1週間培養した。

##### [0076] 結果

共存培養後の未熟胚の重量を測定した。3回の試験を行ったが、いずれの試験においても接種源液体培地に硫酸銅あるいはグルコン酸銅を加えた場合、無添加の対照の未熟胚に比べ、旺盛な増殖を示した(図7)。このことから、硫酸銅およびグルコン酸銅の添加によるカルス増殖の促進は共存培地だけでなく接種源の液体培地に添加した時にも同様にみられることが明らかとなった。

#### 実施例5 再分化培地への硫酸銅、グルコン酸銅の添加がトウモロコシ形質転換植物の生育に及ぼす効果

##### 材料および方法

トウモロコシ(品種:A188)の未熟胚(大きさ1.0〜1.5mm)に*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB131)を接種し、PPTを含むLSD1.5培地で培養することにより形質転換カルスを得た。形質転換カルスを約2mmの大きさに刻み10  $\mu$  Mの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ あるいはグルコン酸銅、およびPPTを含むLSZ再分化培地に置

床した。照明下、25℃で3週間培養し、再分化した植物の葉長を測定した。

[0077] **結果**

硫酸銅あるいはグルコン酸銅含む再分化培地で再分化した植物の葉長は対照の再分化培地で再分化した植物に比べ有意に長く、硫酸銅あるいはグルコン酸銅に再分化植物の生長を促進する効果のあることが示された(図8)。

実施例6 再分化培地への硫酸銅、グルコン酸銅の添加がイネ形質転換植物の生育に及ぼす効果

材料および方法

イネ(品種:ゆきひかり)の未熟胚に*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pSB134)を接種し、ハイグロマイシンを含むnN6CC培地(N6無機塩、N6ビタミン、0.5g/lカザミノ酸、0.5g/l L-プロリン、1mg/l 2, 4-D、0.5mg/l NAA、0.1mg/l 6BA、20g/l シュークロース、55g/l ソルビトール、250mg/l セフトキシム、250mg/l カルベニシリン、5g/l ゲルライト、pH5.8)で培養することにより形質転換カルスを得た。形質転換カルスを約2mmの大きさに刻み10μMのCuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>Oあるいはグルコン酸銅、およびハイグロマイシンを含むN6R再分化培地(主要無機塩を1/2に減じたN6無機塩、N6ビタミン、AAアミノ酸、1g/lカザミノ酸、0.5mg/l カイネチン、20g/l シュークロース、30g/l ソルビトール、4g/l ゲルライト、pH5.8)に置床した。照明下、25℃で3週間培養し、再分化した植物の葉長を測定した。

[0078] **結果**

硫酸銅あるいはグルコン酸銅含む再分化培地で再分化した植物の葉長は対照の再分化培地で再分化した植物に比べ有意に長く、硫酸銅あるいはグルコン酸銅に再分化植物の生長を促進する効果のあることがイネにおいても示された(図9)。

産業上の利用可能性

[0079] 本発明は、従来のアグロバクテリウム法よりもより高い効率で遺伝子導入のなされる安価で簡便な方法を開発する。また、従来のアグロバクテリウム法では遺伝子導入が困難とされていた植物種および品種にも適応できる方法を提供する。本発明の方法は、通常の濃度の金属塩を含む培地を用いた場合と比較して、遺伝子導入効率およ

び／または形質転換効率を向上させ、および／または再分化植物の生長を促進させる。

[0080] 図1に示したように、硫酸銅を高濃度含む共存培地を用いることにより、単子葉植物であるトウモロコシについての遺伝子導入効率が、硫酸銅を含まない培地を用いたときと比較して2倍ないし2.5倍に向上した。また、さらに加熱・遠心処理を加えることで、遺伝子導入効率は硫酸銅を含まない培地および未処理の植物材料を用いたときと比較して1.5倍ないし3倍に向上した。

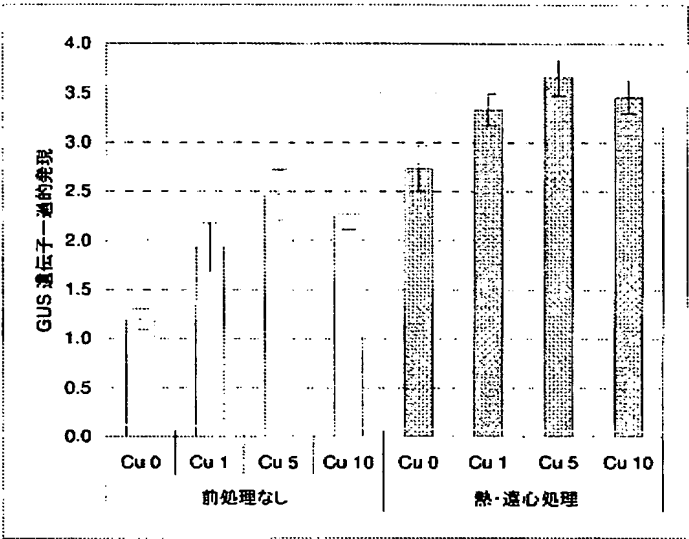
[0081] 本発明により、植物のアグロバクテリウム法による遺伝子導入効率が向上したことから、多数の形質転換植物を効率よく得ることができ、実用遺伝子を導入した品種の育成を効率よく、容易にするのに貢献する。特に、単子葉植物、なかでもトウモロコシは従来のアグロバクテリウム法では形質転換効率が低かったため、本発明の方法により形質転換効率が向上したことの意義は大きい。

## 請求の範囲

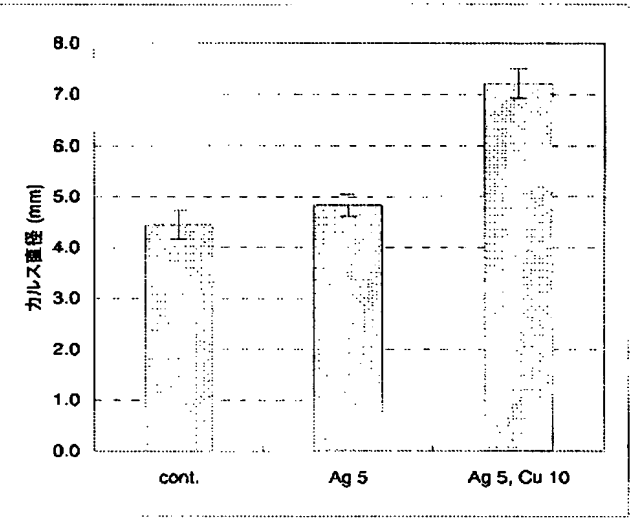
- [1] 1)植物材料を調製し、次いで  
2)植物材料をアグロバクテリウムに感染させる、  
ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介して植物材料への遺伝子導入を行う方法  
であって、上記1)および／または2)の工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度  
を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法。
- [2] 金属塩が、硫酸銅またはグルコン酸銅である、請求項1に記載の方法。
- [3] 金属塩が、硫酸銅である、請求項1に記載の方法。
- [4] 少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)において金属塩の  
濃度を高めた培地を用いる、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)において、硫酸銅ま  
たはグルコン酸銅の濃度を高めた培地を用いる、請求項1ないし4のいずれか1項に  
記載の方法。
- [6] 少なくとも、植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)において、 $1\sim 50\ \mu\text{M}$   
M、好ましくは $1\sim 10\ \mu\text{M}$ の硫酸銅またはグルコン酸銅を含む培地を用いる、請求  
項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
- [7] 植物材料を調製する工程1)、および／または、植物材料をアグロバクテリウムに感  
染させる工程2)において、加圧処理、熱処理、遠心処理、および超音波処理からな  
る群から選択される、少なくとも1の処理を植物材料に行うことをさらに含む、請求項1  
ないし6のいずれか1項に記載の方法。
- [8] 植物が、単子葉植物である、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [9] 植物が、トウモロコシである、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [10] 植物が、イネである、請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
- [11] 植物材料が未熟胚である、請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。
- [12] 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)に次いで、さらに、  
3)形質転換細胞を選抜し、  
4)所望により選抜された形質転換体を再分化する、  
工程を含む、請求項1ないし11に記載の方法。

- [13] 植物材料をアグロバクテリウムに感染させる工程2)に次いで、さらに、少なくとも以下の1の段階において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いて、
- 3) 形質転換細胞を選抜し、
  - 4) 所望により選抜された形質転換体を再分化する、
- 工程を含む、請求項1ないし11に記載の方法。
- [14] 請求項12または13に記載の方法を使用することを特徴とする、形質転換植物の製造方法。
- [15] 1) 植物材料を調製し、
- 2) 植物材料をアグロバクテリウムに感染させ、
  - 3) 形質転換細胞を選抜し、そして
  - 4) 選抜された形質転換体を再分化する、
- ことを含む、アグロバクテリウム属細菌を介した植物材料の形質転換による形質転換植物の製造方法であって、上記4)の工程において銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、前記方法。
- [16] 金属塩が硫酸銅またはグルコン酸銅である、請求項15に記載の方法。
- [17] 金属塩の濃度が1〜50  $\mu$  M、好ましくは1〜10  $\mu$  Mである、請求項15または16に記載の方法。
- [18] 植物が単子葉植物である、請求項15ないし17のいずれか1項に記載の方法。
- [19] 植物がトウモロコシである、請求項15ないし17のいずれか1項に記載の方法。
- [20] 植物がイネである、請求項15ないし17のいずれか1項に記載の方法。
- [21] 植物材料が未熟胚である、請求項15ないし20のいずれか1項に記載の方法。
- [22] 脱分化した植物細胞から植物体を再分化させる工程において、銅イオンを含む金属塩の濃度を高めた培地を用いることを特徴とする、再分化植物の生長を促進させる方法。

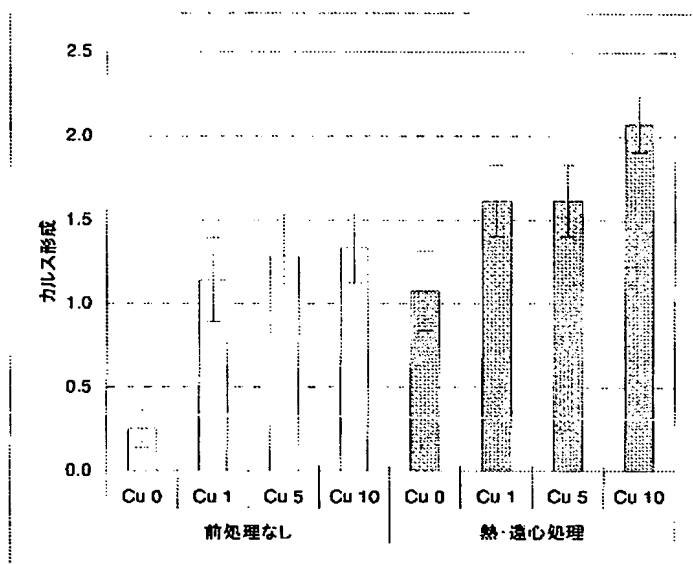
[図1]



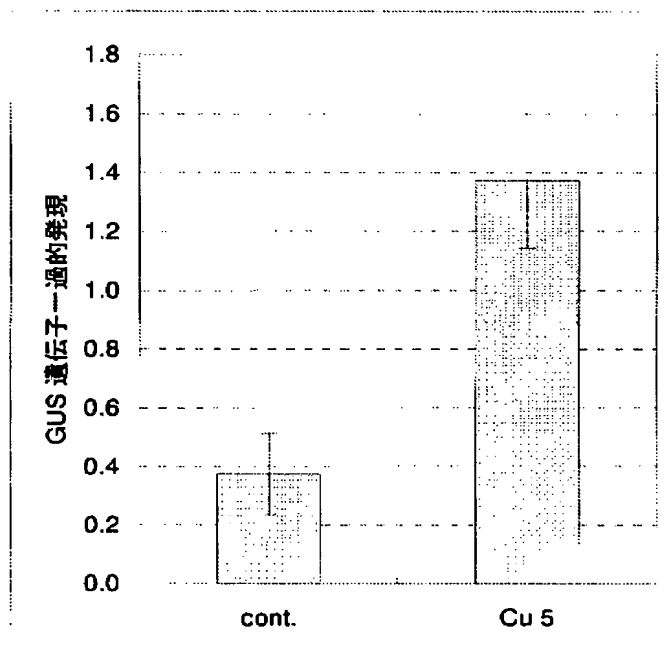
[図2]



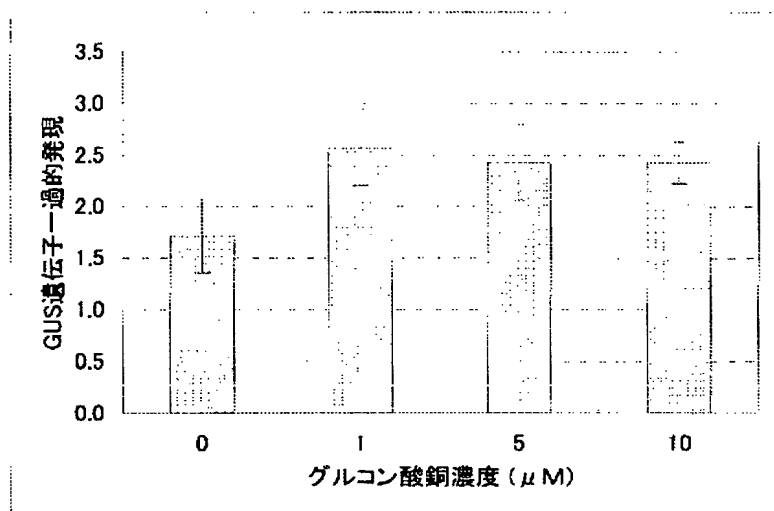
[図3]



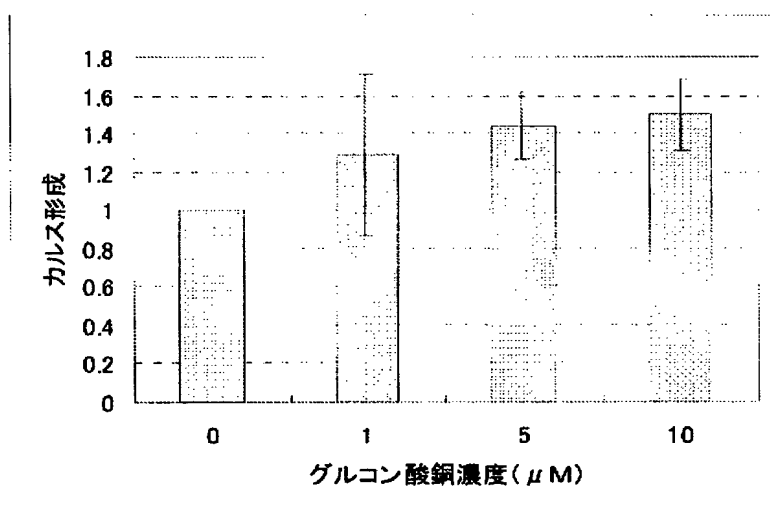
[図4]



[図5]

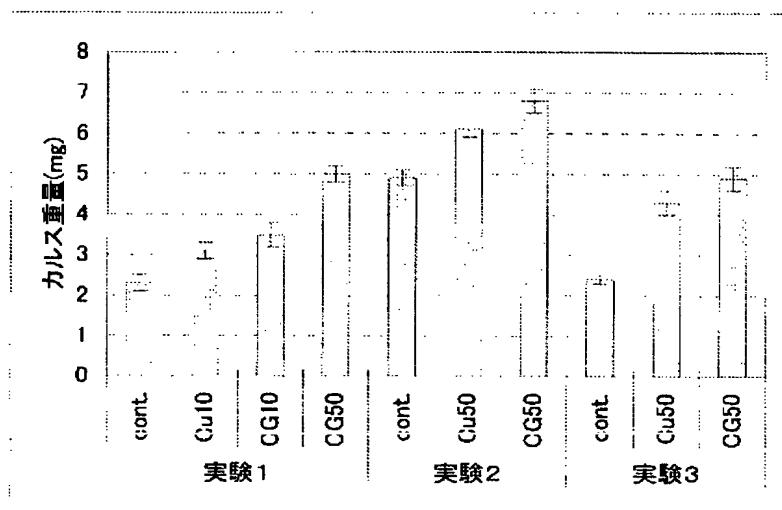


[図6]

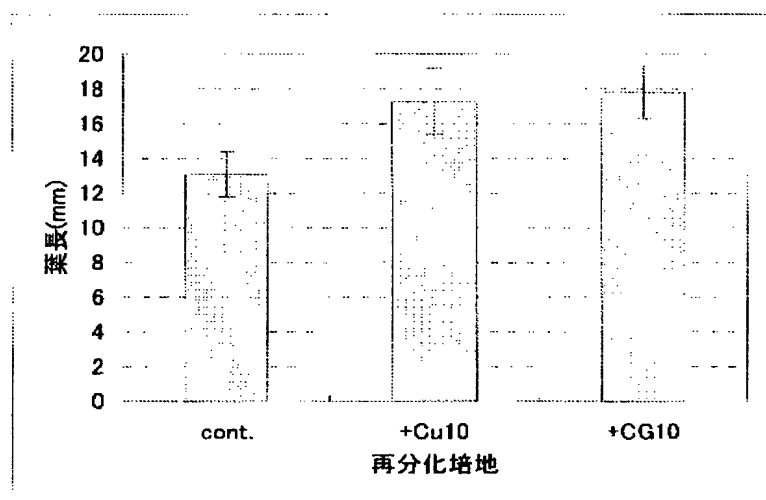




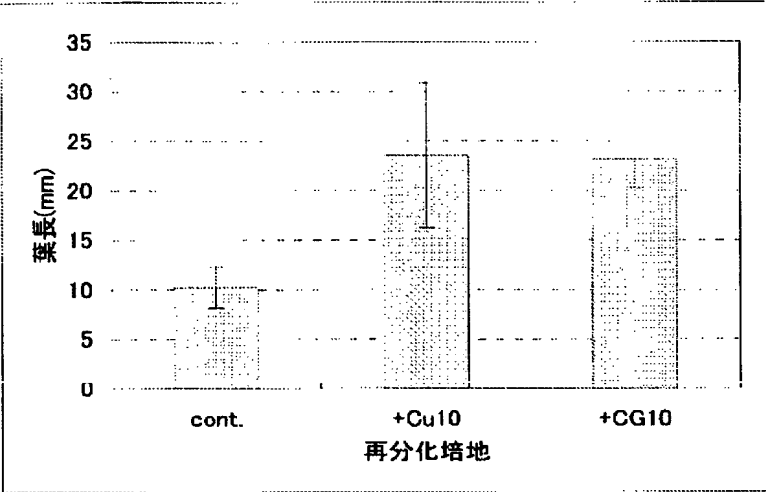
[図7]



[図8]



[図9]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011599

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/14, A01H4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/14, A01H4/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Paola GORI et al., Response of in vitro cultures of Nicotiana tabacum L. to copper stress and selection of plants from Cu-tolerant callus., Plant Cell Tissue Organ.Cult. (1998), Vol.53, No.3, pages 161 to 169	<u>15-22</u> 1-14
<u>X</u> A	Satoshi TOBITA et al., "Shikokubiekarusu no Seicho to Saibunka ni Oyobosu Do no Eikyo", Crop Science Society of Japan Kiji (1989), Vol.58, pages 281 to 282	<u>15-22</u> 1-14
<u>Y</u> A	KR 2003-0045388 A (Doo-Hwan KIM), 11 June, 2003 (11.06.03), (Family: none)	<u>15-21</u> 1-14,22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 October, 2004 (13.10.04)

Date of mailing of the international search report  
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011599

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-39595 A (Lion Corp.), 20 February, 1988 (20.02.88), (Family: none)	1-22
A	Grichko V.P. et al., Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. J.Biotechnol.(2000), Vol.81, No.1, pages 45 to 53	1-22
A	JP 2003-520253 A (GENTERIC, INC.), 02 July, 2003 (02.07.03), & WO 01/52903 A1 & US 2001/51610 A1 & EP 1250156 A1 & US 2004/92483 A1	1-22
A	Emily ALEXANDER et al., The viable-but- nonculturable condition is induced by copper in Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium leguminosarum. Appl.Environ.Microbiol.(1999), Vol.65, No.8, pages 3754 to 3756	1-22

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N5/14, A01H4/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N5/14, A01H4/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Paola GORI, et. al., Response of in vitro cultures of Nicotiana tabacum L. to copper stress and selection of plants from Cu-tolerant callus., Plant Cell Tissue Organ Cult (1998), Vol. 53, No. 3, p. 161-169	<u>15-22</u> 1-14
<u>X</u> A	飛田哲, 他, シコクビエカルの成長と再分化に及ぼす銅の影響, 日本作物学会紀事 (1989), Vol. 58, p. 281-282	<u>15-22</u> 1-14
<u>Y</u> A	KR 2003-0045388 A (Doo-Hwan KIM) 2003. 06. 11 (ファミリーなし)	<u>15-21</u> 1-14, 22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 10. 2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 63-39595 A(ライオン株式会社)1988.02.20 (ファミリーなし)	1-22
A	Grichko VP, et.al., Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn., J Biotechnol. (2000), Vol. 81, No. 1, p. 45-53	1-22
A	JP 2003-520253 A(ジェンテック, インコーポレイテッド)2003.07.02 & WO 01/52903 A1 & US 2001/51610 A1 & EP 1250156 A1 & US 2004/92483 A1	1-22
A	Emily ALEXANDER, et.al., The viable but nonculturable condition is induced by copper in Agrobacterium tumefaciens and Rhizobium leguminosarum., Appl Environ Microbiol. (1999), Vol. 65, No. 8, p. 3754-3756	1-22

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**